

VECTOR FOR DEVELOPMENT, PRODUCTION OF PROTEIN USING SAME AND HOST TRANSFORMED WITH SAID VECTOR

Patent Number: JP61265092
Publication date: 1986-11-22
Inventor(s): NAGAHARI KENJI; others: 07
Applicant(s): MITSUBISHI CHEM IND LTD
Requested Patent: ☐ JP61265092
Application Number: JP19850106659 19850518
Priority Number(s):
IPC Classification: C12N15/00; C12N1/20; C12P21/02
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To obtain a vector to secrete a formed protein to the outside of a cell, by inserting a gene to code a precursor protein wherein a C end amino acid of OmpF signal peptide is directly bonded to an N end amino acid of desired protein into the downstream of a promoter.

CONSTITUTION: A signal peptide gene of OmpF such as psp64OmpF No.21 deficient in PstI site of the upper stream of OmpF promoter, etc. is directly bonded to a structural gene of beta-endorphin to code desired protein. For example, smooth end-Sall end DNA fragment of 138bp is obtained from plasmid pYT3 containing a structural gene of beta-endorphin, which is linked to a vector fragment consisting of smooth end-Sall end obtained from plasmid psp640mpF No.21 with T4DNA ligase, and transformed into strain RRI of Escherichia coli to give plasmid pNM200.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑫ 公開特許公報(A)

昭61-265092

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和61年(1986)11月22日

C 12 N 15/00

7115-4B

C 12 P 21/02

7115-4B

6712-4B ※審査請求 未請求 発明の数 3 (全12頁)

⑭ 発明の名称 発現用ベクター、これを用いる蛋白の産生方法及び該ベクターで形質転換された宿主

⑯ 特 願 昭60-106659

⑰ 出 願 昭60(1985)5月18日

⑱ 発 明 者 長 張 健 二 横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内

⑲ 発 明 者 寺 西 豊 横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内

⑳ 発 明 者 宗 形 香 横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合研究所内

㉑ 出 願 人 三菱化成工業株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目5番2号

㉒ 代 理 人 弁理士 長谷川 一 外1名

最終頁に続く

明 細 書

1 発明の名称

発現用ベクター、これを用いる蛋白の産生方法及び該ベクターで形質転換された宿主。

2 特許請求の範囲

- (1) プロモータの下流に OmpF シグナルペプチドの C 末端アミノ酸と所望の蛋白の N 末端アミノ酸とが直接結合した前駆体蛋白をコードする遺伝子が挿入されてなる発現用ベクター。
- (2) 所望の蛋白が成熟蛋白であることを特徴とする特許請求の範囲第 1 項記載のベクター。
- (3) 成熟蛋白が β -エンドルフィン又はカルデイオナトリンであることを特徴とする特許請求の範囲第 2 項記載のベクター。
- (4) プラスミドベクターであることを特徴とする特許請求の範囲第 1 ～ 3 項のいずれかに記載のベクター。
- (5) 複製起点及び選択マーカーを有し、かつプロモータと前駆体蛋白をコードする遺伝子の転

写方向及び翻訳フレームが一致していることを特徴とする特許請求の範囲第 1 ～ 4 項のいずれかに記載のベクター。

- (6) 複製起点が大腸菌プラスミド pBR322 に由来することを特徴とする特許請求の範囲第 5 項記載のベクター。

- (7) 選択マーカーが抗生物質耐性遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第 5 項記載のベクター。

- (8) 選択マーカーがアンピシリン耐性遺伝子であることを特徴とする特許請求の範囲第 7 項記載のベクター。

- (9) プロモータが入アージの PR 及び PL プロモータ又は OmpF プロモータであることを特徴とする特許請求の範囲第 1 ～ 8 項のいずれかに記載のベクター。

- (10) 入アージの PR 及び PL プロモータが温度感受性レプレッサーで調節されることを特徴とする特許請求の範囲第 9 項記載のベクター。

- (11) 該温度感受性レプレッサーが cI 857 蛋白

であることを特徴とする特許請求の範囲第10項記載のベクター。

02 プロモータの下流に OmpF シグナルペプチドの C 末端アミノ酸と所望の蛋白の N 末端アミノ酸とが直接結合した前駆体蛋白をコードする遺伝子が挿入されてなる発現用ベクターを宿主に導入し、該発現用ベクターで形質転換された宿主を培養し、該前駆体蛋白又は所望の蛋白を取得することを特徴とする蛋白の産生方法。

03 所望の蛋白が成熟蛋白であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

04 該宿主が大腸菌であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の方法。

05 プロモータの下流に OmpF シグナルペプチドの C 末端アミノ酸と所望の蛋白の N 末端アミノ酸とが直接結合した前駆体蛋白をコードする遺伝子が挿入されてなる発現用ベクターで形質転換された宿主。

06 大腸菌であることを特徴とする特許請求の

範囲第1項記載の宿主。

3 発明の詳細な説明

<産業上の利用分野>

本発明は、分泌ベクターとして成熟蛋白の産生に应用可能な発現用ベクター、これを用いる蛋白の産生方法及び該ベクターで形質転換された宿主に関する。

<従来の技術>

大腸菌の外膜を構成する蛋白質のひとつである Omp (outer membrane protein) F 蛋白質は、大腸菌が最も多量に生産する蛋白質のひとつである。その遺伝子 OmpF のプロモータやリボソーム結合領域はきわめて効率よく機能しているものと考えられる。OmpF 遺伝子の発現は複雑な制御を受けるが、そのひとつとして OmpF 遺伝子発現の正の制御遺伝子 OmpB 遺伝子が知られており、OmpB 欠損変異株では OmpF 遺伝子は発現しない。また培地の浸透圧によつても制御を受け、高浸透圧培地中では OmpF 遺伝子の発現は抑制される。

OmpF 遺伝子の全塩基配列は本発明者らによ

- 3 -

つて決定されたが、それによれば OmpF 蛋白質はまずアミノ末端に 22 個のアミノ酸よりなるシグナル・ペプチドを有する前駆体として合成される。このシグナル・ペプチドは OmpF 蛋白質の細胞質膜からの分泌に必須の役割を果たしているものと考えられる。さらに OmpF 蛋白質は外膜中で細胞壁を構成するペプチドグリカンと強い親和性をもつた非常に安定な形で多量に存在しており、この性質を利用して菌体から容易に精製することのできる蛋白質でもある。

<発明が解決しようとする問題点>

組換え DNA 技術により大腸菌中に産生させた蛋白は、分解されやすくまたその蓄積は大腸菌にとつて負荷となるので、産生蛋白を細胞外に分泌可能な分泌ベクターの開発が望まれている。

また、所望の蛋白を融合蛋白としてでなく、成熟蛋白として細胞外に分泌できれば、融合蛋白を分解する工程が省かれ、蛋白の精製上からも好ましい。

- 4 -

<問題点を解決するための手段>

プロモータの下流に OmpF シグナルペプチドの C 末端アミノ酸と所望の蛋白の N 末端アミノ酸とが直接結合した前駆体蛋白をコードする遺伝子が挿入されてなる発現用ベクターを宿主に導入し、該発現用ベクターで形質転換された宿主を培養すると、該前駆体蛋白又は所望の蛋白が得られることを見出し、本発明を完成するに至つた。

本発明によれば、シグナルペプチドによつて前駆体蛋白は細胞質膜を通過し、その後シグナルペプチダーゼによつてシグナルペプチドの C 末端アミノ酸と所望の蛋白の N 末端アミノ酸との間が切断されて、所望の蛋白は成熟蛋白として得られる。

本発明を詳細に説明すると、本発明のベクターは、通常プラスミドベクターである。

本発明のベクターは、プロモータの下流に OmpF シグナルペプチドの C 末端と所望の蛋白の N 末端が直接結合した前駆体蛋白をコードする遺

伝子を含有するが、宿主中で複製するためには、同ベクターは複製起点を有しなければならない。複製起点としては、大腸菌プラスミド pBR322 の複製起点、酵母の 2 μ m DNA の複製起点、酵母染色体 DNA の複製起点を含む *ars*、SV40 ウイルスの複製起点、パピローマウイルスの複製起点等が挙げられる。

本発明のベクターで形質転換された宿主を選択するためには、同ベクターは選択マーカーを有しなければならない。このような選択マーカーとしては、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子等の抗生物質耐性遺伝子、*HIS 3*、*TRP 1*、*LEU 2*、*URA 3* 遺伝子等の大腸菌の変異を相補できる遺伝子、*HSV tk* 遺伝子、*aprt* 遺伝子等が挙げられる。

また、本発明のベクターに挿入された前駆体蛋白をコードする遺伝子が発現するためには、プロモータと同遺伝子の転写方向及び翻訳フレームを常法により一致させる必要がある。

- 7 -

次に、本発明のベクターを造成する方法について説明する。

OmpF シグナルペプチドの C 末端部分は以下のアミノ酸配列を有する。

Ala - Asn - Ala - (↓) (所望の蛋白のアミノ酸配列)
シグナルペプチド - せは、C 末端のアラニンと所望の蛋白の N 末端アミノ酸との間を切断する。上記したアミノ酸配列を有する前駆体蛋白をコードする遺伝子は、OmpF シグナルペプチド及び OmpF 蛋白の N 末端をコードする遺伝子中に存在する *Pst* I 部位を利用して構築できる。すなわち、OmpF シグナルペプチド及び OmpF 蛋白の N 末端をコードする遺伝子を *Pst* I で消化すると以下のとおりの塩基配列をもつた DNA 断片が得られる。

-2	-1	+1	
- Asn	Ala	Ala	<i>Pst</i> I
- AAA	GOT	GOA	
- TTG	GG		

- 9 -

本発明のベクターに含まれるプロモータとしては OmpF プロモータ、*lac* プロモータ、*trp* プロモータ、*tac* プロモータ、*lpp* プロモータ、酸性ホスファターゼ遺伝子 *PHO 5* のプロモータ、*GAL 1* あるいは *GAL 10* 遺伝子のプロモータ、*HIS 4* 遺伝子のプロモータ、*OYC 1* 遺伝子のプロモータ、*ADR 2* 遺伝子のプロモータ、SV40 初期プロモータ等が挙げられる。なお、SV40 初期プロモータを挿入すれば、SV40 ウイルスの複製起点、パピローマウイルスの複製起点をも含む本発明の発現用ベクターは、O 18 細胞、O H O 細胞、マウス L tk⁻ 細胞、Vero 細胞等の動物細胞を宿主としうる。

本発明のベクター中に含まれる所望の蛋白をコードする遺伝子としては、生理活性を有する有用な蛋白をコードする遺伝子であれば特に制限されないが、本発明のベクターは、 β -エンドルフィン、カルディオナトリン、IFN、HSA、IL-2、アポリポ蛋白等の表現に有利に使用される。

- 8 -

この DNA 断片に 3' → 5' エクソヌクレアーゼ活性を有する T4 DNA ポリメラーゼを作用させると、本鎖部分が除去されて以下の DNA 断片が得られる。

-2	-1
- Asn	Ala
- AAA	GO
- TTG	CG

ところで、アラニンをコードするコドン GCT、GCG、GCA、GCG の 4 つであるから、上記したアラニンのコドンを完成させるためには、所望の蛋白をコードする遺伝子の 3' 末端にさらに T、C、A 又は G のいずれかとそれに相補性の塩基を有するヌクレオチドを付加した DNA 断片を上記 DNA 断片と連結させれば上記前駆体蛋白をコードする遺伝子が得られる。

さらに、上記した T4 DNA ポリメラーゼを作用させて得られる DNA 断片に *Hpa* I リンカーを付加させると以下のとおりの 3' 末端部分の

DNA断片が得られる。

— 1 —
— Asn Ala
— AAC GGG TTA AG
— TTG GGG AAT TG

上記DNA断片をMlu Iで消化すると以下のDNA断片が得られる。

— 2 —
— Asn Ala
— AAL
— TTG GGG

上記DNA断片の一本鎖部分を埋めて(fill-in)から所望の蛋白をコードするDNA断片と連結させるかあるいは所望の蛋白^のアミノ酸配列をコードするDNA断片と上記DNA断片とを合成リンカーを介して連結することにより、上記前駆体蛋白をコードするDNA断片が得られる。

<実施例>

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説

明するが、本発明はその要旨を越えない限り以下の実施例によつて限定されるものではない。

なお、実施例において、制限酵素、修飾酵素等の処理は、これらの試薬の製造・販売者~~の~~(宝酒造株式会社、New England Biolabs)の指示書に従つて行なつた。たとえば、制限酵素BamHI、Bgl II、EcoRI、Sma I、Sal I、SauJA、Pvu I

による消化は次の酵素反応液で行なつた。

BamHI : 10mM Tris-HCl, pH 8.0

7mM MgCl₂

100mM NaCl

2mM 2-メルカプトエタノール

0.01% ウシ血清アルブミン

Bgl II : 10mM Tris-HCl, pH 7.5

7mM MgCl₂

100mM NaCl

7mM 2-メルカプトエタノール

— 11 —

EcoRI : 50mM Tris-HCl, pH 7.5

7mM MgCl₂

100mM NaCl

7mM 2-メルカプトエタノール

0.01% ウシ血清アルブミン

Sma I : 10mM Tris-HCl, pH 8.0

7mM MgCl₂

20mM KCl

7mM 2-メルカプトエタノール

0.01% ウシ血清アルブミン

Sal I : 10mM Tris-HCl, pH 7.5

7mM MgCl₂

175mM NaCl

0.2mM EDTA

7mM 2-メルカプトエタノール

0.01% ウシ血清アルブミン

— 12 —

SauJA : 10mM Tris-HCl, pH 7.5

7mM MgCl₂

100mM NaCl

Pvu I : 10mM Tris-HCl, pH 8.0

7mM MgCl₂

150mM KCl

7mM 2-メルカプトエタノール

0.01% ウシ血清アルブミン

また、T4 DNAポリメラーゼ、アルカリホスファターゼ、又はT4 DNAリガーゼによる処理は、次の酵素反応溶液を用いて行なつた。

T4 DNAポリメラーゼ:

67mM Tris-HCl, 77mM MgCl₂, 10mM

2-メルカプトエタノール, 67μM EDTA, 166mM

(NH₄)₂SO₄, 0.0167% ウシ血清アルブミン,

0.2mg/ml 熱変性仔牛胸腺DNA, 各330μM dGTP,

dATP, 330μM [³H]-dTTP, pH 8.8 溶液

アルカリホスファターゼ:

1M Tris-HCl, 1mM p-ニトロフェニルホスファ
ート, pH 8.0 溶液

T4 DNA リガーゼ:

66mM Tris-HCl, 6.6mM MgCl₂, 10mM DTT
0.1-1.0mM ATP, pH 7.6 溶液

なお、大腸菌の形質転換は、"Molecular Cloning"
第250頁、Cold Spring Harbor Laboratory
(1982)記載の方法に準じて行なった。

実施例1

(β -エンドルフィン直接発現用ベクターの
構築)(第1、2図参照。)

プラスミド pHP 006 (特開昭60-47682
号公報参照)を PstI で消化し、(OmpF プロ
モーターを含む)178bpの PstI 断片を得た。
一方、プラスミド pSP64 [Nucleic Acid
Res. 12, 7055(1984)]を PstI で消化し、両者を
T4 DNA リガーゼにより連絡した。ついで大腸
菌 RRI 株への形質転換により大腸菌内に導入

し、アンピシリン耐性株よりプラスミドを精製
し、OmpF プロモーターが pSP64 に対して正方
向に挿入されたプラスミド pSP64 OmpF を得
た。

つぎにプラスミド pSP64 OmpF の OmpF プ
ロモーター上流に位置する PstI 切断部位を除
去するため、pSP64 OmpF を HindIII で消化後、
Bal 31 を作用させ近接する PstI 部位を除去
し、T4 DNA ポリメラーゼで断片末端を平滑末
端にした後、HindIII リンカー存在下で T4 DNA
リガーゼと反応させ、得られた DNA サンプル
により大腸菌 RRI 株の形質転換を行なった。

ミニスクリーニングにより上流の PstI 部位の
ないプラスミドを形質転換株から単離し、OmpF
プロモーター上流の PstI 部位を欠失した pSP64
OmpF 621 を得た。

ついで、OmpF のシグナルペプチド遺伝子と β -
エンドルフィン構造遺伝子を直接結合するた
め、まず、プラスミド pSP64 OmpF 621 を
PstI で消化し、T4 DNA ポリメラーゼにより

-15-

3'-本鎖 DNA 末端の除去及び BalI 消化に
より平滑末端 -BalI 末端からなるベクター断
片を得た。また、 β -エンドルフィン構造遺伝
子を含むプラスミド ^{pYT3}~~pYT3~~ (特開昭58-92696
号公報参照)を HhaI で消化し、T4 DNA ポリ
メラーゼによる 3'-本鎖 DNA 末端の除去、
ついで BalI で消化し138bpの平滑末端 -
BalI 末端 DNA 断片を得た。

このベクター断片と138bp DNA 断片を T4
DNA リガーゼで連結し、大腸菌 RRI 株への
形質転換によりプラスミド pNM 200 を得た。

Omp シグナルペプチド遺伝子と β -エンドルフ
イン遺伝子接合部位の塩基配列決定を ^{Maxam}~~Maxam~~
Gilbert 法で行ない、予想された塩基配列であ
ることを確認した。

参考例1

実施例1で得られたプラスミド pNM 200 に
て形質転換された大腸菌 N99 を、M-9 培地
[Experiments in Molecular Genetics, 43/
頁、Cold Spring Harbor Laboratory (1972)]

-16-

を用いて培養した。後期対数増殖期において集
菌し、常法により、細胞の各成分の分離を行な
った[分離は Journal of Bacteriology 145,
2, 1085-1090 (1980)に記載された方法
によった。]。

^培地及び各成分について、 β -エンドルフィン
["I"]を標識として、ラジオイムノアッセイ
により β -エンドルフィンの産生量を調べた。
結果は、培地中に 2.8 ng/l、ペリプラズム中
に 96 μ g/l であり、大部分が菌体外に分泌産
生されたことがわかる。

参考例2

(プラスミド pRLX 14 の構築)(第3 ~~図~~ ^図参照)

(I) プラスミド pPLe 236 (Gene 15, 81-93
1981 参照)を、EcoRI, PvuI で処理
(37°C, 4時間)し、1100 bp の DNA
断片を得た。ついで、Bal31A で消化(37
°C, 4時間)し、251 bp の断片を得た。

(II) プラスミド pRK1 の^造作成

-17-

-589-

-18-

プラスミド pBR 3.2 を Ola I、Bam H I で消化 (37℃、4時間) し、大きい断片を得、一方、入 DNA を Ola I、Ecl II で消化 (37℃、4時間) し、約 1000 bp の DNA 断片を得、ついで両断片を T4 DNA リガーゼで連結した。

得られたプラスミドを Eco R I で消化した後 T4 DNA ポリメラーゼ処理し、完全な二重鎖の平滑末端とし、さらにリガーゼ処理した。

つぎに、Bal I で消化した後、Bal I / エキソヌクレアーゼで処理して二重鎖 DNA の末端を分解し、リンカー $\begin{smallmatrix} 5' A A T T C C 3' \\ 3' T T A A G G 5' \end{smallmatrix}$ を付加し、リガーゼ処理する。

ついで Eco R I で消化し、さらにリガーゼ処理し、プラスミドを得る。その中より、572 bp の Eco R I - Hind III 断片を含むプラスミド pOQVJ を得る。

プラスミド pOQVJ を Eco R I、Acc I で消化し、大きい断片を得る。

一方、プラスミド pKO I (Gene Amplifica-

tion and Analysis Vol II、J8J(Elsevier 社 North Holland) (1981) 参照。) を Eco R I、Acc I で消化し小さい断片を得る。

この両断片をリガーゼ処理して連結し、プラスミド pRK I (4.9 Kb) を得た。

(III) プラスミド pRLK / 4 の^造作成

上記(II)で得た 251 bp の断片を DNA ポリメラーゼで修復し、平滑末端とし、上記プラスミド pRK I を Sma I で消化して得られる大断片とリガーゼにより連結し、プラスミド pRLK / 4 (5.2 Kb) を得た。

実施例 2

実施例 1 で得られたプラスミド pSP 6.4 Omp^F 版 2 / を Pst I で消化し、T4 DNA ポリメラーゼで断片末端を平滑化し、Hpa I リンカー存在下で T4 DNA リガーゼと反応させ、Hpa I リンカーを付加したプラスミド pSP 6.4 Omp^F (Hpa I リンカー-) を得た。ついでこのプラスミドを Hind III 及び Mlu I で消化し 180 bp の DNA 断片を得、さらに Mnl I で消化し、(Omp^F 遺伝子の

-19-

翻訳
非~~コード~~領域には Mnl I 部位が存在する。) Omp^F シグナル領域を含む DNA 断片を得た。一方、参考例 2 で得られたプラスミド pRLK / 4 を Nru I、Mlu I で消化し、上記 Omp^F シグナル領域を含む DNA 断片と T4 DNA リガーゼ^{P_R}を用いて連結した。得られたプラスミドは入^{P_L}及び~~プロモーター~~を有し、Omp^F シグナルペプチドをコードする DNA の切断点に唯一の Mlu I 部位を有するプラスミドである (第 4 図参照)。

参考例 3

(プラスミド pRLK / 4-m の構築) (第 5 及び 6 図参照)

プラスミド pSP 6.5 (〜30 Kb、米国 ^{プロメガ}Promega ^{バイオテック}Biotech 社製) を Eco R I、Hind III で処理し (37℃、4時間)、T4 DNA ポリメラーゼで処理し (37℃、1時間)、多くの制限酵素認識部位を有する 49 bp の断片を得た。

一方、上記プラスミド pRLK / 4 (5.2 Kb) を Nru I で消化 (37℃、4時間) し、さらにアルカリホスファターゼ処理 (60℃、30分間)

-20-

した後、上記 49 bp の断片と連結した (12℃、16時間) 得られたプラスミド pRLK / 4-m の制限酵素切断地図を第 6 図に示す。

ユニーク部位: Bac I、Sma I、Ava I、Bam H I、Xba I、Bal I

実施例 3

実施例 1 で得られた、Hpa I リンカー付加プラスミド (pSP 6.4 Omp^F (Hpa I リンカー-) を、Hind III 及び Hpa I で消化し 180 bp の DNA 断片を得、さらに Mnl I で消化し、80 bp の DNA 断片を得た。

一方、プラスミド pUO 8 を Hinc II で消化し、これを上記 80 bp 断片と T4 DNA リガーゼにより連結した。得られたプラスミド及び参考例 3 により得られるプラスミド pRLK / 4-m-1 を、それぞれ Bam H I 及び Mlu I で消化し、T4 DNA リガーゼを用いて連結し、目的とするプラスミド pRLK / 4-m-Omp^F (第 7 図) を得た。

得られたプラスミドは入^{P_R}及び^{P_L}プロモーターを有し、Omp^F シグナルペプチドの切断点にユニ-

クな制限酵素部位、MluI 部位を有する。

実施例 4

(カルディオナトリン直接発現用ベクターの構築)(第 8 図参照)

実施例 2 で得たプラスミド pSP64 Omp F (Hpa I リンカー) を MluI 及び BamH I で消化して得られる断片、第 8 図に示す合成リンカー並びにプラスミド pANP 48 (Nature 310 699, 1984 参照) を Bam H I で消化して得られるカルディオナトリン(アミノ酸 4 ~ 28)をコードする遺伝子を含む 190 bp DNA 断片を T4 DNA リガーゼを用いて連結し、Omp F シグナルペプチドの C 末端アミノ酸と成熟カルディオナトリンの N 末端アミノ酸とが直接結合した前駆体蛋白をコードする遺伝子を Omp F プロモータの下流に含有するプラスミド pSP64FA を得た。

プラスミド pSP64FA を用いて常法により大腸菌 N 99 を形質転換させ、成熟カルディオナトリンの産生量をラジオイムノアッセイで測定したと

と、菌体外に 1 µg/ℓ のカルディオナトリンが検出されたが、菌体内にはカルディオナトリンは検出されなかつた。

<発明の効果>

本発明のベクターは、分泌ベクターとして成熟蛋白を細胞外に分泌させることができる。

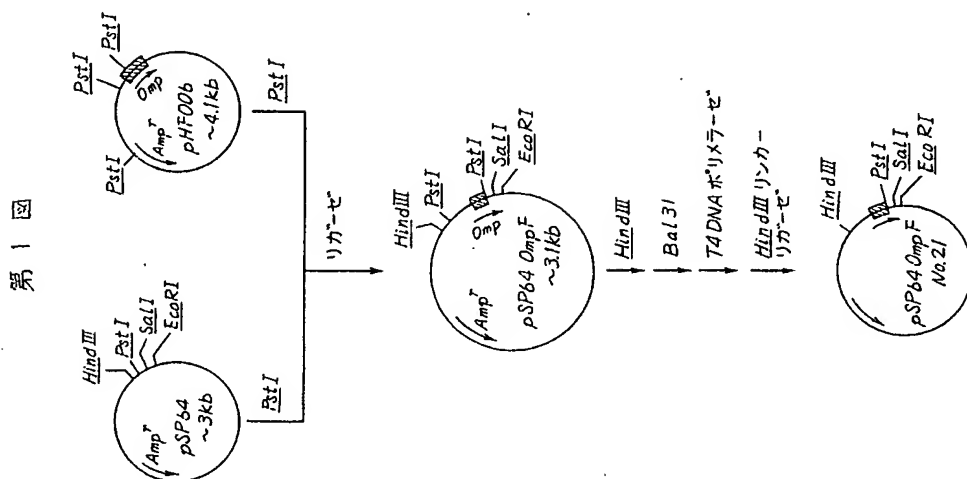
4 図面の簡単な説明

第 1 図及び第 2 図は成熟 β-エンドルフィンを表現させるための本発明のプラスミド pNM 200 の造成を示す工程図であり、第 3 図は本発明はプラスミドベクター pRLK 14 の造成を示す工程図であり、第 4 図及び第 5 ~ 7 図は、Omp F シグナルペプチドをコードする DNA の 3' 末端に所望の蛋白をコードする DNA を MluI 部位を利用して挿入可能なベクターの構築を示す図であり、第 8 図は成熟カルディオナトリンを表現させるための本発明のプラスミド pSP64FA の構築を示す図である。

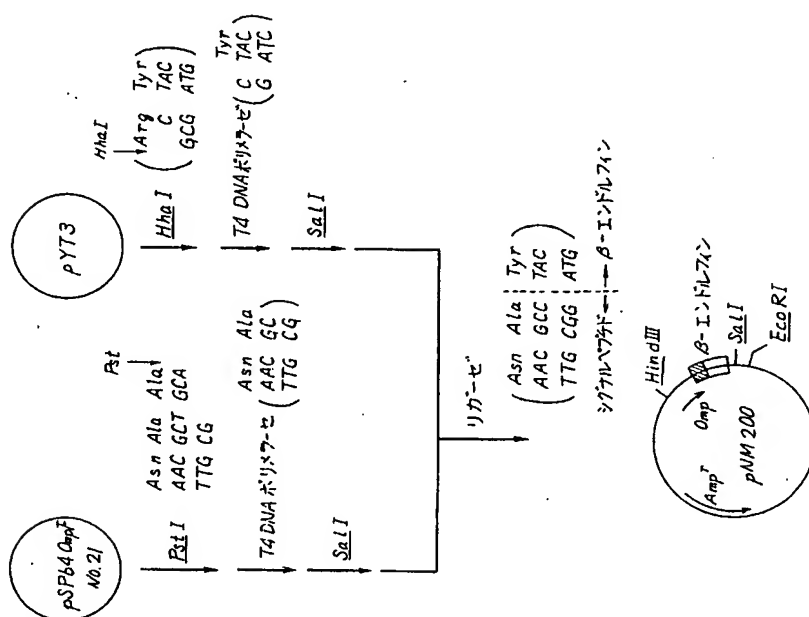
出 願 人 三菱化成工業株式会社
代 理 人 弁理士 長谷川 一
ほか 1 名

- 23 -

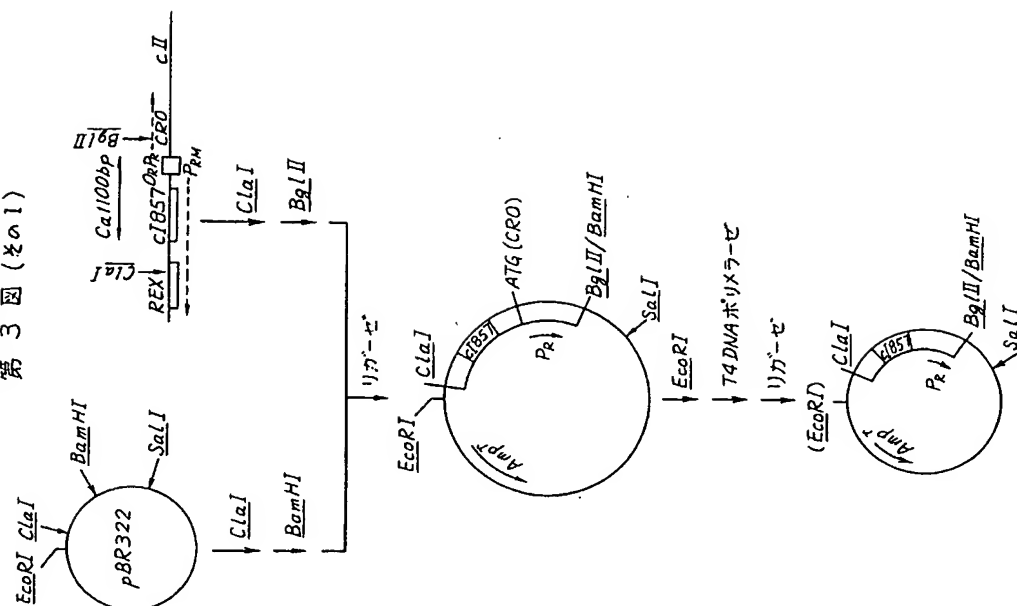
- 24 -



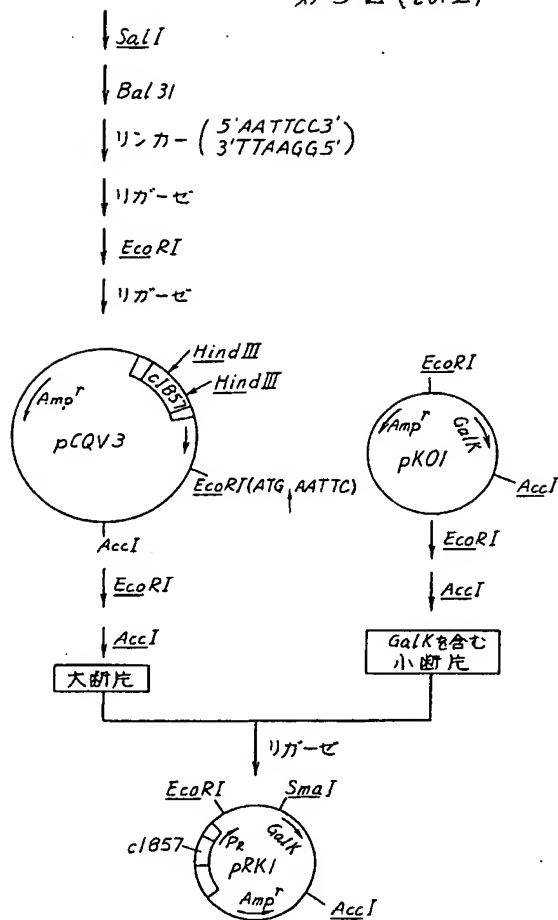
第 2 図



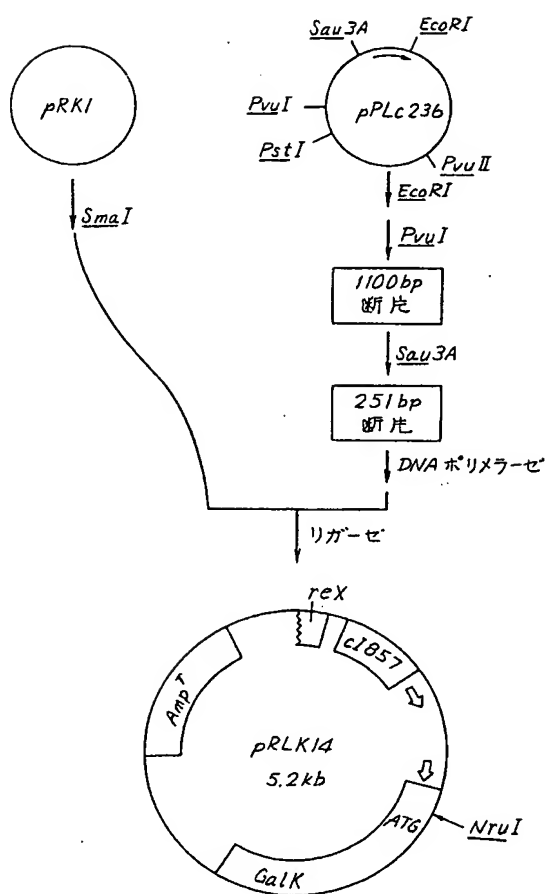
第 3 図 (201)



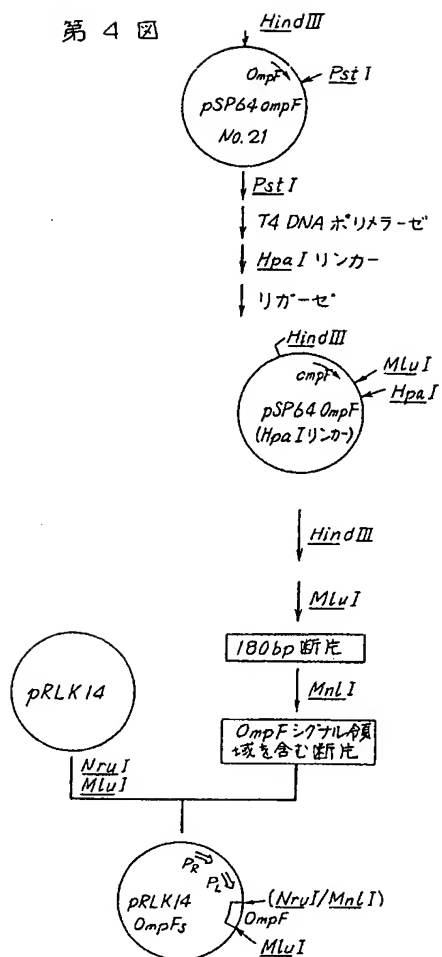
第3図(その2)



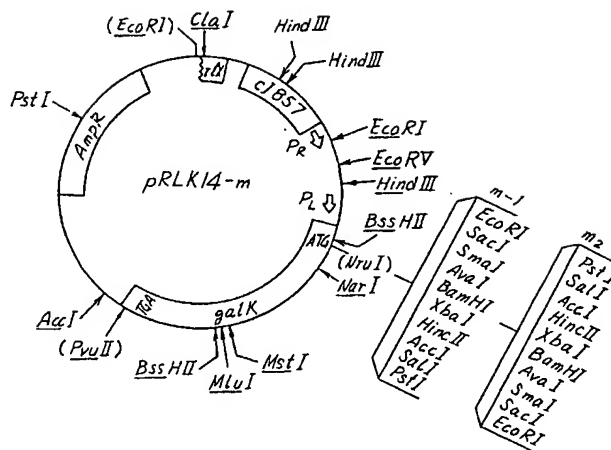
第3図(その3)



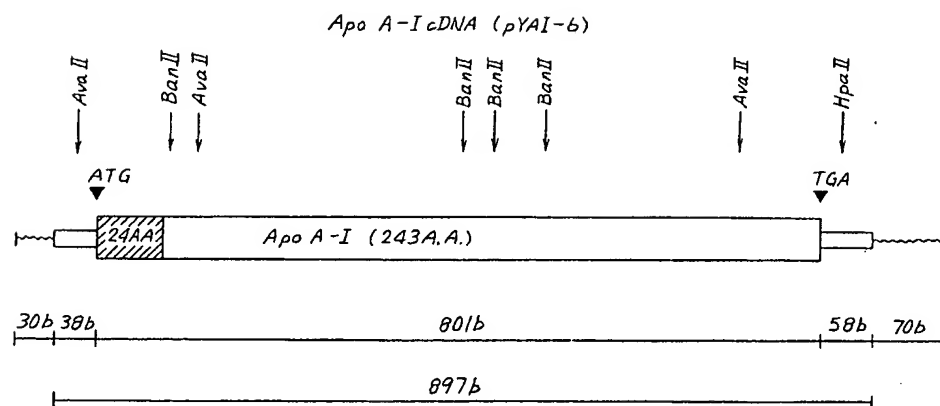
第 4 図



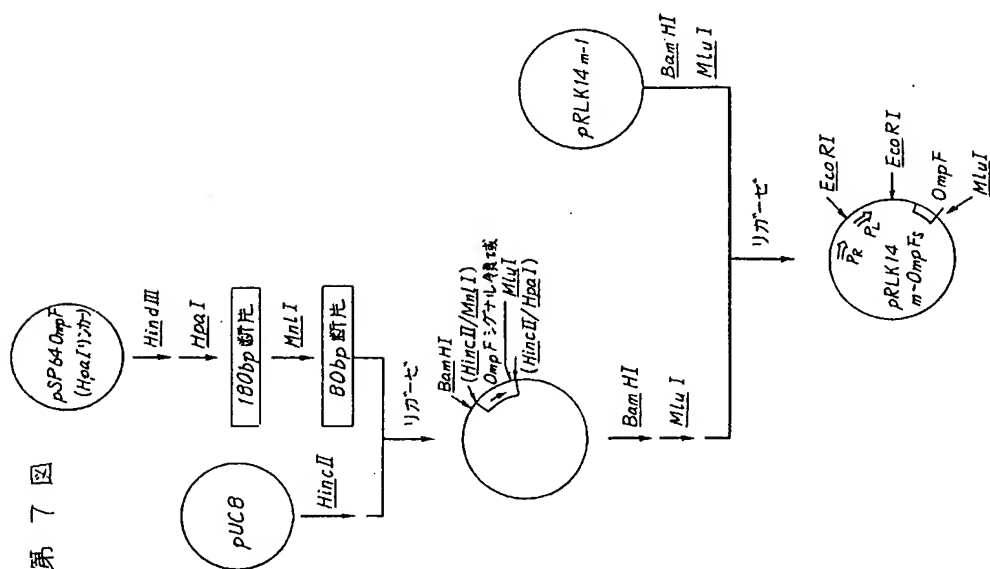
第 5 図



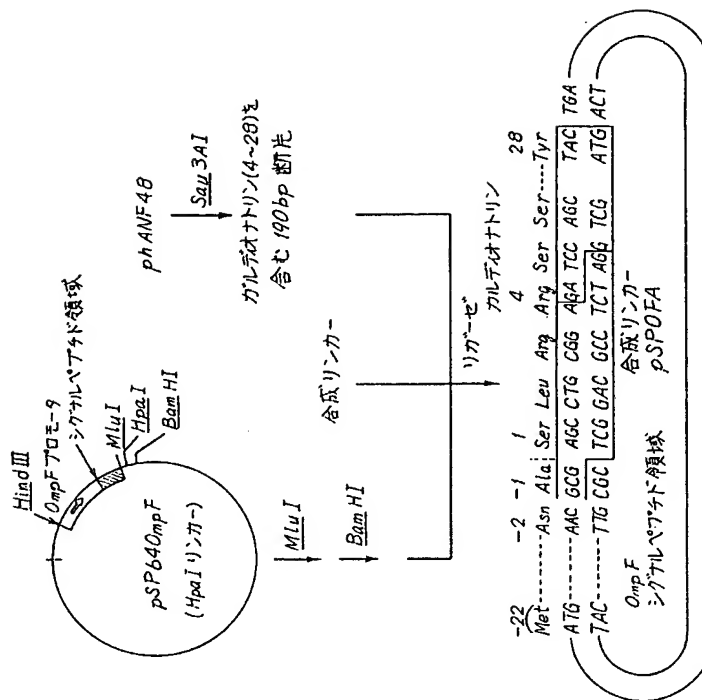
第 6 図



第 7 図



第 8 図



第1頁の続き

⑤Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

//(C 12 N 1/20
 C 12 R 1:19)
 (C 12 P 21/02
 C 12 R 1:19)

⑫発明者	池田	康子	横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合 研究所内
⑫発明者	木村	昌子	横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合 研究所内
⑫発明者	田中	秀穂	横浜市緑区鴨志田町1000番地 三菱化成工業株式会社総合 研究所内
⑫発明者	室岡	義勝	東広島市高屋町大字中島152番62
⑫発明者	水島	昭二	名古屋市天白区天白町15番6号